



Original

Efecto del alcohol y sus metabolitos en el cáncer de pulmón: estudio CAPUA



Sara M. Álvarez-Avellón^{a,b}, Ana Fernández-Somoano^{a,b,*}, Eva M. Navarrete-Muñoz^{b,c}, Jesús Vioque^{b,c} y Adonina Tardón^{a,b}

^a Unidad de Epidemiología Molecular del Cáncer, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Departamento de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, Asturias, España

^b Consorcio de Investigación Biomédica Español en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

^c Departamento de Salud Pública, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, Alicante, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de julio de 2016

Aceptado el 14 de diciembre de 2016

On-line el 22 de febrero de 2017

Palabras clave:

Alcohol
Cáncer de pulmón
Polimorfismos
Acetaldehído
Folato

R E S U M E N

Antecedentes y objetivo: El alcohol y sus metabolitos tienen un papel importante en la carcinogénesis, pudiendo estar este efecto modulado por polimorfismos en genes que codifican enzimas participantes en el metabolismo de alcohol y folato. Por ello, analizamos el efecto que podría tener el consumo de alcohol y los polimorfismos *ADH1B* Arg48His, *ADH1B* Arg370Cys, *ADH1C* Ile349Val, *ALDH2* Glu540Lys, *CYP2E1* RsaI, *CYP2E1* DraI, *CYP2E1* TaqI y *MTHFR* C677T en el riesgo de cáncer de pulmón.

Pacientes y método: Se incluyeron 876 casos de cáncer de pulmón y 840 controles del estudio caso-control de base hospitalaria CAPUA. El genotipado de los SNP se realizó mediante la tecnología Sequenom MassArray (iPLEX GOLD).

Resultados: Un consumo de alcohol de 0,1-9,9 g/día disminuye el riesgo de cáncer de pulmón ($OR_{ajustada} = 0,71$; IC 95% 0,48-1,05), aunque no se alcanza la significación estadística. Un consumo de alcohol ≥ 30 g/día y de tabaco ≥ 36 paquetes/año aumenta el riesgo de cáncer de pulmón ($OR_{ajustada} = 26,68$; IC 95% 12,69-56,10). Por otro lado, un consumo elevado de verduras ($\geq 116,65$ g/día) o de frutas ($\geq 233,13$ g/día) disminuye el riesgo de cáncer de pulmón con un consumo de alcohol de 0,1-9,9 g/día ($OR_{ajustada} = 0,52$; IC 95% 0,30-0,89; $OR_{ajustada} = 0,58$; IC 95% 0,33-1,03, respectivamente). Un consumo de alcohol de 10-29,9 g/día en individuos portadores del alelo *ADH1B* 48His aumenta el riesgo de cáncer de pulmón ($OR_{ajustada} = 3,32$; IC 95% 1,03-10,70).

Conclusiones: El alcohol y polimorfismos en genes que participan en el metabolismo del alcohol y del folato están relacionados con el cáncer de pulmón.

© 2017 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Effect of alcohol and its metabolites in lung cancer: CAPUA study

A B S T R A C T

Keywords:

Alcohol
Lung cancer
Polymorphisms
Acetaldehyde
Folate

Background and objective: Alcohol and its metabolites play an important role in carcinogenesis. This effect could be modulated by polymorphisms in genes encoding enzymes involved in the metabolism of alcohol and folate. Therefore, we analyzed the effect of alcohol consumption and *ADH1B* Arg48His, *ADH1B* Arg370Cys, *ADH1C* Ile349Val, *ALDH2* Glu540Lys, *CYP2E1* RsaI, *CYP2E1* DraI, *CYP2E1* TaqI and *MTHFR* C677T polymorphisms on the risk of developing lung cancer.

Patients and methods: We included 876 lung cancer cases and 840 controls of the CAPUA hospital-based case-control study. Genotyping was performed using the Sequenom MassArray (iPLEX GOLD) technology.

Results: An alcohol consumption of 0.1-9.9 g/day decreased lung cancer risk ($OR_{adjusted} = 0.71$; 95% CI 0.48-1.05), although statistical significance was not achieved. A consumption ≥ 30 g/day of alcohol and ≥ 36 PY of tobacco increases lung cancer risk ($OR_{adjusted} = 26.68$; 95% CI 12.69-56.10). On the other hand, a high

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fernandezsana@uniovi.es (A. Fernández-Somoano).

consumption of vegetables (≥ 116.65 g/day) and fruits (≥ 233.13 g/day) decreases lung cancer risk with an alcohol consumption of 0.1–9.9 g/day ($OR_{\text{adjusted}} = 0.52$; 95% CI 0.30–0.89; $OR_{\text{adjusted}} = 0.58$; 95% CI 0.33–1.03, respectively). An alcohol consumption of 10–29.9 g/day in ADH1B 48His allele-carriers increases lung cancer risk ($OR_{\text{adjusted}} = 3.32$; 95% CI 1.03–10.70).

Conclusions: Alcohol and polymorphisms in genes involved in the metabolism of alcohol and folate are related to the onset of lung cancer.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Aproximadamente un total de 770.000 casos de cáncer a nivel mundial, que representan el 5,5% de todos los cánceres, derivan del consumo crónico de alcohol, y 480.000 muertes, que suponen el 5,8% del total de muertes por cáncer a nivel mundial, son atribuibles al consumo de alcohol¹. Actualmente, la *International Agency for Research on Cancer* (IARC, «Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer») ha clasificado los cánceres de cavidad oral, faringe, laringe, esófago, hígado, colorrectal y el de mama en mujeres como los cánceres de mayor riesgo (Grupo 1) asociados al consumo de alcohol². Sin embargo, la relación entre consumo de alcohol y cáncer de pulmón continúa siendo controvertida porque la evidencia epidemiológica actual no ha constatado una asociación clara de riesgo o protección a desarrollar este tipo de neoplasia^{3,4}.

Uno de los principales mecanismos que pueden contribuir a la carcinogénesis mediada por el alcohol incluye el efecto tóxico del acetaldehído, primer metabolito de la oxidación del etanol, dado que el acetaldehído presente en las bebidas alcohólicas está clasificado como «carcinógeno en humanos»⁵. Experimentos en animales y cultivos celulares muestran claramente que el acetaldehído es carcinogénico porque tiene un efecto mutagénico y puede afectar al ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN⁶.

El hecho de que el alcohol pueda actuar como un agente carcinógeno también puede ser debido, en parte, a la existencia de variaciones o alteraciones genéticas, entre las que destacamos los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) en los genes que participan en el metabolismo del etanol y del acetaldehído, como son *ADH*, *ALDH* y *CYP2E1*. Polimorfismos funcionales presentes en estos genes actúan alterando la velocidad de síntesis del metabolito tóxico acetaldehído o disminuyendo su posterior oxidación a acetato, dando lugar a diferencias en la exposición a acetaldehído entre los bebedores⁷. Está demostrado que individuos que acumulan acetaldehído debido a estos polimorfismos tienen un mayor riesgo de cáncer⁸. Es más, el consumo de alcohol podría interactuar con otros genes, como el *MTHFR*, que codifica una enzima implicada en el metabolismo del folato, compuesto que participa en la metilación, la síntesis y la reparación del ADN. El alcohol es un antagonista del folato, afectando a la biodisponibilidad de este último, lo que podría dar lugar a la alteración de la expresión genética y de la integridad genómica.

Las alcohol deshidrogenasas (ADH) son enzimas que oxidan el etanol en acetaldehído. Cuando el consumo de alcohol es elevado, la citocromo P4502E1 (*CYP2E1*) es inducida y oxida el etanol a acetaldehído, al tiempo que produce *reactive oxygen species* (ROS, «especies reactivas de oxígeno»). Posteriormente, el acetaldehído es oxidado a acetato por la aldehído deshidrogenasa (*ALDH*). Por otro lado, un consumo elevado de alcohol parece interferir con la utilización del folato, ya que provoca la escisión de este compuesto. La enzima *MTHFR* desempeña un papel central en el metabolismo del folato, regulando el flujo de este entre 2 importantes vías: la producción de timidilato y purinas para la síntesis de ADN y el suministro de grupos metilo para la síntesis de metionina y la metilación del ADN.

En este trabajo se analizan los polimorfismos Arg48His y Arg370Cys en el gen *ADH1B* y el polimorfismo Ile349Val en el gen

ADH1C. Los alelos variantes 48His y 370Cys codifican una subunidad superactiva, con una $V_{\text{máx}}$ 40 veces superior y 90 veces superior, respectivamente³. En el caso del polimorfismo Ile349Val, el alelo variante 349Val da lugar a una reducción de 2,5 veces en la oxidación del alcohol a acetaldehído³; en el gen *CYP2E1* estudiamos los polimorfismos *TaqI*, *RsaI* y *DraI*. Los alelos variantes de los polimorfismos *RsaI* y *DraI* se asocian con una mayor actividad transcripcional, niveles elevados de proteína y una mayor actividad enzimática. La posible implicación funcional del polimorfismo *TaqI* aún no está establecida³. En el caso del gen *ALDH2*, seleccionamos el polimorfismo Glu504Lys. El alelo variante Lys da lugar a una subunidad inactiva de la enzima; y por último, para el gen *MTHFR*, el polimorfismo C677T. En este caso, el alelo variante T es comúnmente llamado «termolábil», porque la actividad de la enzima codificada se reduce a 37 °C o más³.

Material y métodos

El estudio Cáncer de Pulmón en Asturias (CAPUA) es un análisis caso-control de base hospitalaria. Los detalles del método de selección de los participantes para este estudio ya han sido descritos^{9–13}. Brevemente, se seleccionaron un total de 969 casos incidentes en los hospitales de Gijón (Hospital de Cabueñes), Avilés (Hospital de San Agustín), Mieres (Hospital Álvarez Buylla) y Oviedo (Hospital Universitario Central de Asturias), siguiendo un protocolo idéntico desde octubre de 2000 a diciembre de 2010. Los sujetos elegibles fueron casos incidentes de cáncer de pulmón, con una edad comprendida entre los 30 y los 85 años y residentes, durante al menos 6 meses antes del diagnóstico, en las áreas de influencia de los hospitales participantes. Todos los casos fueron confirmados histológicamente, a excepción de aquellos en estadio IV avanzado, para los cuales la cirugía no era apropiada, y, por lo tanto, no tienen confirmación histológica. El diagnóstico de estos casos fue confirmado por el oncólogo y fueron definidos como diagnóstico clínico. Un total de 870 controles fueron seleccionados entre pacientes que ingresaron en los mismos hospitales de los casos para cirugía, con enfermedades no relacionadas con ningún factor de riesgo conocido de cáncer de pulmón, y emparejados por frecuencia por hospital, sexo y edad (± 5 años). Las principales enfermedades específicas de los controles seleccionados fueron las siguientes: hernias abdominales e inguinales (*International Classification of Diseases, tenth revision* [ICD-10, «Clasificación Internacional de Enfermedades, décima revisión»]: K40–K46); lesiones (ICD-10: S00–S99); apendicitis (ICD-10: K35); y obstrucciones intestinales (ICD-10: K56, K57, K60). El estudio fue aprobado por el comité ético regional del Principado de Asturias, y cada participante firmó un consentimiento informado. Desde 2010, el estudio CAPUA ha sido incluido en el *International Lung Cancer Consortium* (<http://ilcco.iarc.fr>) y en el grupo SYNERGY (<http://SYNERGY.iarc.fr>) de la IARC^{14,15}.

Un 93,31% de los individuos elegibles aceptaron participar en el estudio y fueron entrevistados (876 casos y 840 controles). De estos individuos se recogieron muestras biológicas de un total de 1.695 (98,78%), de los cuales 871 son casos (51,39%) y 825, controles (48,61%).

Recolección de datos

Para la obtención de los datos referentes a los factores de riesgo conocidos o potenciales para el cáncer de pulmón, un entrevistador entrenado realizó una entrevista personal al caso o control durante la primera estancia hospitalaria del sujeto. Para ello se utilizó un cuestionario estructurado e informatizado, en el que se recogen datos sobre variables sociodemográficas básicas, antecedentes familiares y personales de cáncer, posibles factores de riesgo (endógenos, medioambientales, estilos de vida y ocupacionales) y datos clínicos (histología, grado y diferenciación del tumor).

La sección de dieta del cuestionario valoraba la frecuencia de consumo y el tamaño habitual de la porción o ración de 127 ítems de alimentos (incluidas las bebidas alcohólicas), y se usó para estimar el consumo diario de alcohol y de calorías. Las raciones estándar de vino tinto (125 ml), vino blanco (125 ml), cerveza (200 ml), jerez (50 ml), sidra (125 ml), licores dulces (30 ml), y coñac, ginebra, ron, *whisky* y vodka (40 ml) fueron calculadas a partir de las tablas de composición de los alimentos y contienen 13,25; 13,25; 6,15; 3,06; 7,80; 7,40; y 14,25 g de etanol, respectivamente. Se recogió el consumo medio de alcohol durante los 5 años anteriores a la entrevista y los sujetos participantes se agruparon en 4 categorías basadas en los terciles del consumo de alcohol (ajustado por energía) entre los controles: no bebedores, <0,1 (categoría de referencia en el análisis); 0,1–9,9; 10–29,9; y ≥ 30 g/día.

Para evaluar la ingesta diaria habitual de alimentos y nutrientes se utilizó un *food frequency questionnaire* (FFQ, «cuestionario de frecuencia de alimento») semicuantitativo de 101 ítems. El FFQ fue una versión modificada de un FFQ previo basado en el cuestionario de Harvard¹⁶, y que se desarrolló y validó usando 4 registros de una semana de la dieta en población adulta en Valencia. Los coeficientes de correlación de validez y reproducibilidad (ajustados por consumo de energía) oscilaron entre 0,38 para la reproducibilidad de los carotenoides y 0,44 para la validez de la vitamina C^{17,18}. A los sujetos participantes en este estudio se les preguntó por la frecuencia media habitual con que habían consumido cada alimento durante los 5 años anteriores. Los valores de los nutrientes se obtuvieron, principalmente, de las tablas de composición de los alimentos de las publicaciones del Departamento de Agricultura de los EE. UU.¹⁹, así como de otras fuentes publicadas para la comida española y los tamaños de las porciones (tablas del CESNID)²⁰. Para obtener la ingesta diaria de nutrientes para cada individuo, se multiplicó la frecuencia de ingesta de cada alimento por la composición de nutrientes de la ración o porción especificada en el FFQ y se sumaron las de todos los alimentos para obtener la ingesta total de cada nutriente.

Los sujetos participantes fueron definidos como fumadores si habían fumado alguna vez de forma habitual, es decir, al menos un cigarrillo por día durante 6 meses o más; el resto fueron definidos como no fumadores. Los fumadores se clasificaron a su vez en fumadores actuales, si durante el año previo a la entrevista o más, habían estado fumado al menos un cigarrillo al día durante 6 meses o más; los individuos que habían fumado regularmente, pero que habían dejado de fumar al menos un año antes de la entrevista fueron definidos como exfumadores; aquellos individuos que habían dejado de fumar menos de un año antes de la entrevista fueron incluidos, por tanto, en fumadores actuales. A los fumadores se les preguntó el tiempo, en años, que habían estado fumando al menos un cigarrillo al día y cuántos cigarrillos solían fumar diariamente. La intensidad del hábito tabáquico se definió posteriormente en paquetes/año (PY), calculados multiplicando el número de paquetes de cigarrillos fumados al día por el número de años que el sujeto ha estado fumando esa cantidad de tabaco. Los sujetos se clasificaron como fumadores leves (<36 PY) o grandes fumadores (≥ 36 PY), basándose en la media del consumo de la distribución de los PY del grupo control.

Genotipado de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs)

El ADN genómico utilizado para el genotipado se extrajo a partir de muestras de sangre periférica o a partir de células procedentes de enjuague bucal, mediante técnicas ya descritas²¹.

El genotipado de los SNP estudiados se ha realizado mediante la tecnología Sequenom MassArray (iPLEX GOLD), llevada a cabo en el Centro Nacional de Genotipado, Nodo Santiago²².

Análisis estadístico

Todas las ingestas de nutrientes y grupos de alimentos fueron transformados logarítmicamente (base natural) para mejorar su normalidad. Posteriormente se estimaron las ingestas de nutrientes ajustadas por ingesta calórica total. Para ello se utilizó el método de los residuos, denominado también de Willett, donde cada nutriente se ajusta en un modelo de regresión lineal con las calorías totales y los residuos se añaden a la ingesta media del nutriente en la población de estudio¹⁶. Se calcularon también cuartiles de ingesta para alimentos y nutrientes ajustados por calorías totales. De acuerdo con esto, las categorías para frutas y verduras se basan en los cuartiles del grupo control.

Se comprobó que la población estuviera en equilibrio Hardy-Weinberg. Para la comparación de variables continuas entre distintos grupos de individuos se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para las variables categóricas se empleó el test Chi-cuadrado.

En el análisis multivariante se empleó el método de regresión logística no condicionada. Se utilizaron los test LR y Wald para estudiar las variables que entraban o salían del modelo, valorando confusión y estudiando si existía interacción entre distintos factores. Por último, se estudió –a través de test de bondad de ajuste (test de Hosmer-Lemeshow)– cómo de efectivo es el modelo.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico Stata 12.1.

Resultados

Las características de los individuos participantes en el estudio se recogen en la [tabla 1](#). Existen diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles en cuanto a la media de edad (66,11 frente a 64,46 años), el consumo de tabaco (61,83 frente a 36,00 PY), el consumo medio de verduras (123,33 frente a 156,34 g/día), el consumo medio de frutas (242,36 frente a 268,96 g/día) y el consumo medio de calorías (2.403,37 frente a 2.275,73 Kcal/día). Histológicamente, el carcinoma epidermoide (40,39%) es el principal tipo de cáncer de pulmón.

En la [tabla 2](#) se analiza el riesgo de cáncer de pulmón en función del consumo de alcohol. Se observa una tendencia no estadísticamente significativa hacia un efecto protector frente al desarrollo de cáncer de pulmón con un consumo de alcohol de 0,1–9,9 g/día ($OR_{ajustada} = 0,71$; IC 95% 0,48–1,05).

Al analizar el consumo de alcohol y según el consumo de tabaco, se observa una clara modificación de efecto, observando el mayor aumento de riesgo de cáncer de pulmón en individuos en las categorías de mayor consumo de alcohol (≥ 30 g/día) y tabaco (≥ 36 PY), siendo este incremento del riesgo de más de 26 veces ($OR_{ajustada} = 26,68$; IC 95% 12,69–56,10) ([tabla 3](#)). Por otro lado, al examinar la modificación del efecto del alcohol en el riesgo de cáncer de pulmón según el consumo de verduras y frutas, encontramos que tanto un consumo elevado de verduras ($\geq 116,65$ g/día) como de frutas ($\geq 233,13$ g/día) reducen a la mitad el riesgo de cáncer de pulmón para un consumo de alcohol de 0,1–9,9 g/día ($OR_{ajustada} = 0,51$; IC 95% 0,30–0,89; $OR_{ajustada} = 0,58$; IC 95% 0,33–1,03, respectivamente) ([tabla 4](#)).

Tabla 1
Distribución de los casos de cáncer de pulmón y los controles del estudio

Variable	Casos (n = 876; 51,05%)	Controles (n = 840; 48,95%)	p ^a
Sexo, n (%)			
Hombre	777 (88,70)	723 (86,07)	
Mujer	99 (11,30)	117 (13,93)	0,101
Edad (años), media (DE)	66,11 (10,6)	64,46 (11,08)	0,002
Paquetes/año, media (DE)	61,83 (36,09)	36,00 (30,37)	<0,001
Nunca	56 (6,39)	245 (29,17)	
< 36	171 (19,52)	353 (42,02)	
≥ 36	649 (74,09)	242 (28,81)	<0,001
Hábito tabáquico, n (%)			
No fumador	56 (6,39)	245 (29,17)	
Fumador	820 (93,61)	595 (70,83)	<0,001
Exfumador	368 (42,11)	358 (42,93)	
Fumador actual ^b	450 (51,49)	231 (27,70)	<0,001
Consumo de alcohol (g/día)			
Media (DE)	27,61 (44,65)	23,96 (40,68)	0,134
No bebedor (< 0,1)	129 (21,98)	136 (21,12)	
0,1-9,9	136 (23,17)	204 (31,68)	
10-29,9	146 (24,87)	143 (22,20)	
≥ 30	176 (29,98)	161 (25,00)	0,008
Calorías			
Media (DE)	2.403,37 (844,32)	2.275,73 (698,03)	0,004
Ingesta de verduras (g/día), n (%)			
Media (DE)	123,33 (102,90)	156,34 (138,81)	<0,001
< 67,15	200 (34,07)	161 (25,00)	
67,15-116,65	163 (27,77)	161 (25,00)	
116,65-200,23	122 (20,78)	161 (25,00)	
> 200,23	102 (17,38)	161 (25,00)	<0,001
Ingesta de frutas (g/día), n (%)			
Media (DE)	242,36 (212,44)	268,96 (202,18)	0,025
< 115,76	206 (35,09)	161 (25,00)	
115,76-233,13	145 (24,70)	161 (25,00)	
233,13-375,46	97 (16,52)	161 (25,00)	
> 375,46	139 (23,64)	161 (25,00)	<0,001
Tipo histológico, n (%)			
Epidermoide	353 (40,39)		
Adenocarcinoma	266 (30,43)		
Microcítico	150 (17,16)		
Indiferenciado	53 (6,06)		
Células grandes	25 (2,86)		
Otros	13 (1,49)		
Diagnóstico clínico	14 (1,60)		

^a Chi-cuadrado (variables categóricas), U de Mann-Whitney (variables continuas).

^b Incluye exfumadores desde hace menos de un año.

En negrita resultados estadísticamente significativos.

Tabla 2
Consumo de alcohol y riesgo de cáncer de pulmón

Alcohol (g/día)	Casos/controles	OR bruta (IC 95)	OR ajustada ^a (IC 95%)
No bebedores (< 0,1)	129/136	1,00	1,00
0,1-9,9	136/204	0,70 (0,51-0,97)	0,71 (0,48-1,05)
10-29,9	146/143	1,08 (0,77-1,50)	1,01 (0,68-1,51)
≥ 30	176/161	1,15 (0,83-1,59)	1,23 (0,83-1,82)

^a Ajustada por edad, sexo, paquetes/año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías.

En negrita resultados estadísticamente significativos.

Se determinó la frecuencia de los polimorfismos Arg48His y Arg370Cys en el gen *ADH1B*, Ile349Val en el gen *ADH1C*, Glu504Lys en el gen *ALDH2*, Taql, RsaI y DraI en el gen *CYP2E1* y C677T en el gen *MTHFR* en los pacientes con cáncer de pulmón y en los controles para evaluar su posible asociación con el riesgo de cáncer de pulmón. La distribución de los genotipos de todos los SNP estudiados fueron consistentes con el equilibrio Hardy-Weinberg, excepto en el caso del polimorfismo Glu504Lys en el gen *ALDH2*. No se encontró ninguna asociación entre los polimorfismos analizados y el riesgo de cáncer de pulmón. En el caso del polimorfismo Glu504Lys en el

gen *ALDH2*, todos los individuos son homocigotos salvajes Glu/Glu y, por ello, no se han podido hacer más análisis para este polimorfismo (tabla 5).

A continuación se analizó la posible modificación que pueden ejercer los polimorfismos estudiados en la asociación del consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de pulmón (tabla 6). En el caso del polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B*, se observa que un consumo de alcohol entre 10-29,9 g/día, en individuos portadores del alelo variante His, aumenta el riesgo de cáncer de pulmón en más de 3 veces (OR_{ajustada} = 3,65; IC 95% 1,14-11,73). Para el polimorfismo

Tabla 3

Consumo de alcohol y riesgo de cáncer de pulmón estratificado por tabaco

Alcohol (g/día)	Casos/controles OR ajustada ^a (IC 95%)		
	No fumador	< 36 paquetes/año	≥ 36 paquetes/año
No bebedores (<0,1)	20/63 1,00	22/41 3,33 (1,50-7,40)	87/32 23,17 (10,75-49,94)
0,1-9,9	11/62 0,75 (0,32-1,78)	36/94 2,47 (1,19-5,14)	89/48 13,94 (6,53-29,76)
10-29,9	7/34 0,99 (0,36-2,70)	27/64 3,28 (1,48-7,24)	112/45 19,52 (9,21-41,37)
≥ 30	2/32 0,48 (0,10-2,30)	31/81 3,60 (1,64-7,88)	143/48 26,68 (12,69-56,10)

^a Ajustada por edad, sexo, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías.

En negrita resultados estadísticamente significativos.

Tabla 4

Consumo de alcohol y riesgo de cáncer de pulmón estratificado por consumo de verduras y frutas

Alcohol (g/día)	Casos/controles OR ajustada (IC 95%)			
	Consumo de verduras ^a		Consumo de frutas ^b	
	< 116,65 g/día	≥ 116,65 g/día	< 233,13 g/día	≥ 233,13 g/día
No bebedor (<0,1)	73/57 1,00	56/79 0,63 (0,36-1,09)	65/48 1,00	64/88 0,76 (0,44-1,34)
0,1-9,9	72/92 0,59 (0,34-1,02)	64/112 0,51 (0,30-0,89)	76/100 0,65 (0,37-1,15)	60/104 0,58 (0,33-1,03)
10-29,9	101/81 0,97 (0,57-1,64)	45/62 0,64 (0,36-1,16)	93/73 1,07 (0,61-1,87)	53/70 0,70 (0,39-1,26)
≥ 30	117/92 1,10 (0,66-1,83)	59/69 0,89 (0,51-1,57)	117/101 1,09 (0,64-1,85)	59/60 1,09 (0,60-1,99)

^a Ajustada por edad, sexo, paquetes/año, frutas (4 cat.) y calorías.^b Ajustada por edad, sexo, paquetes/año, verduras (4 cat.) y calorías.

En negrita resultados estadísticamente significativos.

Rsa1 en el gen *CYP2E1*, se observa que un consumo de alcohol entre 0,1 y 9,9 g/día disminuye el riesgo de cáncer de pulmón en individuos con genotipo homocigoto salvaje c1/c1 (OR_{ajustada} = 0,48; IC 95% 0,28-0,81). Por último, en el polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* se observa que, con un consumo de alcohol de 0,1-9,9 g/día, en individuos con genotipo heterocigoto C/T, el riesgo de cáncer de pulmón disminuye (OR_{ajustada} = 0,51; IC 95% 0,27-0,95); el mismo efecto se observa en individuos con genotipo homocigoto variante T/T con un consumo de alcohol de 10-29,9 g/día (OR_{ajustada} = 0,28; IC 95% 0,08-0,93). Para el resto de los polimorfismos estudiados no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa.

Discusión

Los resultados obtenidos indican un efecto protector a desarrollar cáncer de pulmón en individuos con un consumo de alcohol de 0,1-9,9 g/día. Esta misma asociación ha sido observada en otros estudios realizados en poblaciones europeas^{23,24}. Los efectos antiinflamatorios del consumo moderado de alcohol podrían contribuir a este efecto, dado que se ha demostrado que la ingesta moderada de alcohol está relacionada con concentraciones plasmáticas más bajas de distintos marcadores sistémicos de inflamación en comparación con un consumo elevado o no consumo, así como con un daño oxidativo reducido²⁵, y se ha comprobado el papel de los componentes antioxidantes de las bebidas alcohólicas en la promoción y progresión tumoral²⁶. Además, pequeñas cantidades de alcohol podrían ser necesarias para la inducción de las enzimas de protección, tales como las reparadoras de ADN o las detoxificantes de

carcinógenos. Por tanto, es posible que los efectos beneficiosos del consumo bajo o moderado de alcohol contrarresten la función de promoción del cáncer del etanol y sus metabolitos.

El tabaco modifica claramente el efecto del alcohol, de forma que los individuos que son grandes fumadores y grandes bebedores tienen un aumento del riesgo de cáncer de pulmón de más de 26 veces. Este efecto podría ser debido a que el alcohol actúa como solvente para los carcinógenos presentes en el tabaco, facilitando su penetración³. Además, el alcohol podría aumentar los efectos carcinogénicos del humo del tabaco en los tejidos a través de la inducción de la actividad de las enzimas citocromo P450, las cuales, a su vez, pueden activar procarcinógenos presentes en las bebidas alcohólicas. La presencia de inductores y de substratos precarcinógenos de la *CYP2E1* en el humo del tabaco podría explicar el hecho de que el abuso del alcohol y el tabaquismo interactúan sinérgicamente como factores etiológicos para el cáncer. El aumento del riesgo que observamos en no bebedores refleja el efecto del tabaco en el desarrollo de cáncer de pulmón.

Por otra parte, el consumo de frutas y verduras está relacionado con un menor riesgo de cáncer de pulmón, próstata, vejiga, esófago y estómago. Esto se debe a que son una fuente de sustancias fitoquímicas que tienen muchas propiedades beneficiosas, como su acción antiinflamatoria y antioxidante, la reducción de la toxicidad de las sustancias químicas dañinas, el control de los niveles hormonales y el crecimiento celular²⁷. En este trabajo observamos que un consumo elevado tanto de frutas como de verduras ejerce un efecto protector frente al desarrollo de cáncer de pulmón, evidenciando que un consumo elevado de frutas y verduras podría neutralizar parte del efecto dañino producido por la ingesta de

Tabla 5

Genotipos de ADH/ALDH/CYP2E1/MTHFR y riesgo de cáncer de pulmón

Genotipo	Casos, n (%)	Controles, n (%)	OR bruta (IC 95%)	OR ajustada ^a (IC 95%)
<i>ADH1B Arg48His</i>				
Arg/Arg	706 (83,3)	650 (82,1)	1,00	1,00
Arg/His	136 (16,0)	136 (17,2)	0,92 (0,71–1,19)	0,70 (0,48–1,03)
His/His	6 (0,7)	6 (0,8)	0,92 (0,30–2,87)	0,70 (0,17–2,95)
His carriers ^b	142 (16,8)	142 (17,9)	0,92 (0,71–1,19)	0,70 (0,49–1,02)
<i>ADH1B Arg370Cys</i>				
Arg/Arg	827 (99,2)	773 (98,9)	1,00	1,00
Arg/Cys	7 (0,8)	9 (1,1)	0,73 (0,27–1,96)	0,57 (0,16–2,13)
Cys/Cys	0 (0,0)	0 (0,0)	–	–
Cys carriers ^b	7 (0,8)	9 (1,1)	0,73 (0,27–1,96)	0,57 (0,16–2,13)
<i>ADH1C Ile349Val</i>				
Ile/Ile	372 (44,4)	331 (43,5)	1,00	1,00
Ile/Val	368 (44,0)	340 (44,7)	0,96 (0,78–1,19)	1,11 (0,83–1,47)
Val/Val	97 (11,6)	90 (11,8)	0,96 (0,69–1,32)	1,13 (0,72–1,77)
<i>ALDH2 Glu504Lys</i>				
Glu/Glu	847 (100,0)	793 (100,0)	1,00	1,00
Glu/Lys	0 (0,0)	0 (0,0)	–	–
Lys/Lys	0 (0,0)	0 (0,0)	–	–
<i>CYP2E1 TaqI</i>				
C/C	468 (79,2)	393 (78,1)	1,00	1,00
C/G	117 (19,8)	99 (19,7)	0,99 (0,74–1,34)	1,17 (0,80–1,71)
G/G	6 (1,0)	11 (2,2)	0,46 (0,17–1,25)	0,41 (0,12–1,37)
G carriers ^b	123 (20,8)	110 (21,9)	0,94 (0,70–1,26)	1,08 (0,74–1,56)
<i>CYP2E1 RsaI</i>				
c1/c1	535 (92,2)	499 (91,9)	1,00	1,00
c1/c2	42 (7,2)	42 (7,7)	0,93 (0,60–1,46)	0,79 (0,44–1,40)
c2/c2	3 (0,5)	2 (0,4)	1,40 (0,23–8,42)	6,42 (0,50–82,90)
c2 carriers ^b	45 (7,8)	44 (8,1)	0,95 (0,62–1,47)	0,87 (0,49–1,52)
<i>CYP2E1 DraI</i>				
D/D	691 (81,9)	645 (81,8)	1,00	1,00
D/C	141 (16,7)	135 (17,1)	0,97 (0,75–1,26)	0,97 (0,68–1,38)
C/C	12 (1,4)	9 (1,1)	1,24 (0,52–2,97)	1,83 (0,58–5,74)
C carriers ^b	153 (18,1)	144 (18,2)	0,99 (0,77–1,28)	1,02 (0,72–1,43)
<i>MTHFR C677T</i>				
C/C	339 (40,4)	336 (42,8)	1,00	1,00
C/T	382 (45,5)	349 (44,4)	1,08 (0,88–1,34)	1,25 (0,94–1,66)
T/T	118 (14,1)	101 (12,9)	1,16 (0,85–1,57)	1,44 (0,96–2,18)

^a Ajustada por edad, sexo, paquetes/año, alcohol (g/día), vegetales (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías.^b Portadores del alelo variante (en esta fila se suman las 2 anteriores: heterocigotos + homocigotos variantes).

alcohol, poniendo de manifiesto el efecto beneficioso de consumir muchas frutas y verduras en el riesgo de cáncer de pulmón.

La eficiencia en la conversión de etanol a acetaldehído y la posterior oxidación a acetato está determinada principalmente por la actividad de la ADH y ALDH. Además, el consumo crónico de alcohol conduce a la inducción de la CYP2E1 microsomal. El acetaldehído y las ROS producidas por la actividad CYP2E1 producen lesiones en el ADN, que si no son reparadas iniciarían el proceso de la carcinogénesis. Por todo ello, la etiología del cáncer entre los bebedores se ve afectada por diferencias en el metabolismo del etanol derivadas de la existencia de polimorfismos genéticos en estas enzimas.

No encontramos ninguna asociación entre los polimorfismos estudiados y el riesgo de cáncer de pulmón en la población general. Sin embargo, cuando analizamos conjuntamente la asociación de estos polimorfismos junto con el consumo de alcohol y su posible efecto en el desarrollo de cáncer de pulmón, observamos que el alelo variante His, asociado con una mayor velocidad de oxidación del alcohol, del polimorfismo Arg48His *ADH1B*, aumenta el riesgo de cáncer de pulmón en más de 3 veces cuando el consumo de alcohol es elevado. Esto podría deberse a que al metabolizar el etanol a acetaldehído más rápidamente, estos individuos acumulan una mayor cantidad de acetaldehído en el organismo, por lo que estarían más tiempo expuestos a sus efectos cancerígenos³. En el caso del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1*, el efecto protector del alelo c1 observado en individuos con un consumo de alcohol entre 0,1 y

9,9 g/día podría deberse al hecho de que este alelo está asociado a una menor actividad transcripcional, menores niveles de proteína y una menor actividad enzimática con respecto al alelo variante c2²⁸, por lo que habría una menor activación metabólica de procarcinógenos, una menor producción de ROS, así como de acetaldehído, lo que daría lugar a una menor exposición a compuestos cancerígenos y una menor acumulación de daños en el ADN. Por otra parte, para el polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*, no encontramos una explicación plausible para el menor riesgo observado en individuos con un consumo de alcohol de 10–29,9 g/día y con genotipo heterocigoto C/T, así como en individuos con un consumo de alcohol de 10–29,9 g/día y con genotipo homocigoto variante T/T, ya que la menor actividad de la enzima *MTHFR* atribuida al alelo variante T ha sido asociada con una reducción de los niveles de folato en plasma²⁹ y, debido al papel fundamental que desempeña el folato en el suministro de grupos metilo para la síntesis *de novo* de desoxinucleósidos y para las reacciones de metilación intracelulares³⁰, una menor actividad de la enzima *MTHFR* conduciría a un desequilibrio en el flujo del metabolismo del folato que podría llevar a daños en el ADN, a una reparación alterada del ADN y a una hipometilación del ADN. Más aún, en este caso se sumaría el efecto antagonista que ejerce el alcohol sobre el folato, por lo que el resultado observado no concuerda con lo esperado desde el punto de vista biológico.

Este estudio tiene varios puntos fuertes, incluyendo la alta participación de los sujetos elegibles (93,31%), un tamaño de muestra

Tabla 6

Consumo de alcohol y riesgo de cáncer de pulmón estratificado por genotipos de ADH/ALDH/CYP2E1/MTHFR

Genotipo	Casos/controles OR ajustada ^a (IC 95%)			
	No bebedores (<0,1 g/día)	0,1-9,9 g/día	10-29,9 g/día	≥ 30 g/día
<i>ADH1B</i> Arg48His				
Arg/Arg	102/96 1,00	106/148 0,69 (0,44-1,09)	114/122 0,78 (0,50-1,24)	156/135 1,09 (0,701-1,71)
His carriers ^b	22/26 1,00	26/47 0,80 (0,30-2,15)	28/13 3,65 (1,14-11,73)	17/20 1,33 (0,45-3,89)
<i>ADH1B</i> Arg370Cys				
Arg/Arg	123/119 1,00	127/188 0,68 (0,45-1,02)	138/133 0,93 (0,61-1,41)	171/152 1,16 (0,77-1,74)
Cys carriers ^b	0/1 1,00	2/3 -	2/3 -	0/2 -
<i>ADH1C</i> Ile349Val				
Ile/Ile	55/59 1,00	59/77 0,96 (0,52-1,76)	68/67 1,08 (0,59-1,97)	74/55 1,27 (0,69-2,36)
Ile/Val	52/46 1,00	57/92 0,59 (0,31-1,15)	57/49 1,03 (0,52-2,05)	79/73 1,34 (0,71-2,55)
Val/Val	15/11 1,00	13/16 0,45 (0,11-1,85)	16/17 0,47 (0,13-1,62)	16/19 0,65 (0,18-2,32)
<i>CYP2E1</i> TaqI				
C/C	66/60 1,00	81/96 0,81 (0,46-1,42)	81/81 0,92 (0,52-1,60)	95/84 1,14 (0,65-2,00)
G carriers ^b	21/16 1,00	23/38 0,48 (0,17-1,38)	21/18 0,82 (0,26-2,59)	28/23 0,97 (0,32-2,97)
<i>CYP2E1</i> RsaI				
c1/c1	90/69 1,00	86/116 0,48 (0,28-0,81)	89/91 0,66 (0,39-1,13)	125/117 0,89 (0,54-1,48)
c2 carriers ^b	5/8 1,00	13/15 2,85 (0,37-22,13)	9/9 2,14 (0,29-16,07)	8/6 1,81 (0,22-15,26)
<i>CYP2E1</i> DraI				
D/D	102/97 1,00	110/158 0,68 (0,43-1,08)	110/112 0,85 (0,53-1,35)	142/128 1,08 (0,68-1,68)
C carriers ^b	20/25 1,00	21/37 0,78 (0,28-2,16)	32/22 1,86 (0,69-4,97)	31/27 1,58 (0,61-4,06)
<i>MTHFR</i> C677T				
C/C	45/61 1,00	51/76 0,78 (0,40-1,53)	54/52 1,17 (0,59-2,31)	82/73 1,39 (0,75-2,58)
C/T	57/48 1,00	55/93 0,51 (0,27-0,95)	69/57 0,94 (0,51-1,74)	66/68 0,85 (0,46-1,59)
T/T	22/11 1,00	25/24 0,64 (0,20-2,07)	18/27 0,28 (0,08-0,93)	23/12 1,63 (0,45-5,86)

^a Ajustada por edad, sexo, paquetes/año, vegetales (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías.^b Portadores del alelo variante (heterocigotos + homocigotos variantes).

En negrita resultados estadísticamente significativos.

razonablemente grande de una población homogénea con ascendencia similar (876 casos y 840 controles), y el hecho de que todos los controles estaban en equilibrio Hardy-Weinberg, excepto para el polimorfismo Glu504Lys en el gen *ALDH2*. Además, la mayoría de los casos (98%) fueron confirmados histopatológicamente, con la excepción de 15 casos clasificados como cáncer de pulmón en estadio avanzado, sin la necesidad de confirmación patológica. Las principales limitaciones de este estudio son el uso de sujetos hospitalarios, el sesgo de memoria debido a que la información sobre la exposición al tabaco se obtuvo retrospectivamente, y, especialmente, asociaciones que pueden ser falsos positivos. Debido a las múltiples comparaciones hechas, no podemos excluir la posibilidad de que algunas de estas asociaciones puedan deberse al azar. Para minimizar los sesgos de selección, los controles fueron seleccionados cuidadosamente entre pacientes que ingresaron en el mismo hospital de cada caso con diagnósticos no relacionados con las exposiciones de interés. Otra posible limitación es que no podemos excluir la posibilidad de que alguien que ha bebido alcohol previamente se declare a sí mismo como no bebedor. En cualquier

caso, estaríamos subestimando el efecto del alcohol y los resultados no estarían invalidados.

Este trabajo representa el primer estudio en España donde los polimorfismos Arg48His y Arg370Cys en el gen *ADH2*, Ile349Val en el gen *ADH3*, *RsaI*, *DraI* y *TaqI* en el gen *CYP2E1*, Glu504Lys en el gen *ALDH2* y el polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*, el tabaco, la dieta y el consumo de alcohol se analizan conjuntamente en un esfuerzo para determinar su posible contribución al desarrollo de cáncer de pulmón.

Los resultados muestran un efecto beneficioso de un consumo bajo de alcohol, así como de un consumo elevado de frutas y verduras en el riesgo de cáncer de pulmón. Existe una clara modificación del efecto del alcohol por el tabaco, aumentando el riesgo de esta neoplasia más de 26 veces en individuos que son grandes fumadores y grandes bebedores.

Por otro lado, el alelo variante *ADH1B* 48His aumenta el riesgo de cáncer de pulmón cuando el consumo de alcohol es elevado. Sin embargo, con un consumo bajo-moderado de alcohol, tanto el alelo variante *MTHFR* 677T como el alelo salvaje *CYP2E1* c1 disminuyen

el riesgo. Todo ello indica que el consumo de alcohol está implicado en la susceptibilidad a desarrollar cáncer de pulmón.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación del Gobierno de España (AP2008-04284), Instituto de Salud Carlos III (FISS-PI060604), Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT IB09-133), CIBERESP, Obra Social Cajastur/Fundación Liberbank y la Universidad de Oviedo.

Autoría

Sara M. Álvarez-Avellón fue responsable de la redacción del borrador inicial del artículo, de la realización de los análisis de laboratorio, la adquisición de datos, la interpretación de los datos, la revisión crítica del contenido intelectual y la aprobación definitiva de la versión que se presenta; Ana Fernández-Somoano fue responsable de la adquisición de datos, el análisis estadístico, la redacción del borrador final, la revisión crítica del contenido intelectual y la aprobación definitiva de la versión que se presenta; Eva M. Navarrete-Muñoz fue responsable de la revisión crítica del contenido intelectual y la aprobación definitiva de la versión que se presenta; Jesús Vioque fue responsable de la revisión crítica del contenido intelectual y la aprobación definitiva de la versión que se presenta; Adonina Tardón fue responsable de la concepción y diseño del estudio, de la revisión crítica del contenido intelectual y la aprobación definitiva de la versión que se presenta.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Estamos en deuda con todos los pacientes que han participado en el estudio. Estamos también muy agradecidos al Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias y al Nodo de Santiago del Centro Nacional de Genotipado.

Bibliografía

1. Praud D, Rota M, Rehm J, Shield K, Zatonski W, Hashibe M, et al. Cancer incidence and mortality attributable to alcohol consumption. *Int J Cancer*. 2016;138:1380–7.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC). Personal habits and indoor combustions. Volumen 100 E. A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC; 2012. p. 1–575.
3. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*. 2006;7:149–56.
4. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: A comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. 2015;112:580–93.
5. International Agency for Research on Cancer (IARC). Tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC; 2011.
6. Woutersen RA, Appelman LM, van Garderen-Hoetmer A, Feron VJ. Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III. Carcinogenicity study. *Toxicology*. 1986;41:213–31.
7. Druesne-Pecollo N, Tehard B, Mallet Y, Gerber M, Norat T, Hercberg S, et al. Alcohol and genetic polymorphisms: Effect on risk of alcohol-related cancer. *Lancet Oncol*. 2009;10:173–80.
8. Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, Yokoyama T, Okuyama K, Takahashi H, et al. Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis*. 1998;19:1383–7.
9. Marin MS, Lopez-Cima MF, Garcia-Castro L, Pascual T, Marron MG, Tardon A. Poly (AT) polymorphism in intron 11 of the XPC DNA repair gene enhances the risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:1788–93.
10. Gonzalez-Arriaga P, Lopez-Cima MF, Fernandez-Somoano A, Pascual T, Marron MG, Puente XS, et al. Polymorphism +17C/G in matrix metalloprotease MMP8 decreases lung cancer risk. *BMC Cancer*. 2008;8:378.
11. Leader A, Fernandez-Somoano A, Lopez-Cima MF, Gonzalez-Arriaga P, Pascual T, Marron MG, et al. Educational inequalities in quantity, duration and type of tobacco consumption among lung cancer patients in Asturias: Epidemiological analyses. *Psicothema*. 2010;22:634–40.
12. Lopez-Cima MF, Alvarez-Avellón SM, Pascual T, Fernandez-Somoano A, Tardon A. Genetic polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 metabolic genes and risk of lung cancer in Asturias. *BMC Cancer*. 2012;12:433.
13. Gonzalez-Arriaga P, Pascual T, Garcia-Alvarez A, Fernandez-Somoano A, Lopez-Cima MF, Tardon A. Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival. *BMC Cancer*. 2012;12:121.
14. Vlaanderen J, Portengen L, Schuz J, Olsson A, Pesch B, Kendzia B, et al. Effect modification of the association of cumulative exposure and cancer risk by intensity of exposure and time since exposure cessation: A flexible method applied to cigarette smoking and lung cancer in the SYNERGY Study. *Am J Epidemiol*. 2014;179:290–8.
15. Bigert C, Gustavsson P, Straif K, Pesch B, Bruning T, Kendzia B, et al. Lung cancer risk among cooks when accounting for tobacco smoking: A pooled analysis of case-control studies from Europe, Canada, New Zealand, and China. *J Occup Environ Med*. 2015;57:202–9.
16. Willett WC, Sampson L, Stampfer MJ, Rosner B, Bain C, Witschi J, et al. Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol*. 1985;122:51–65.
17. Vioque J, Weinbrener T, Asensio L, Castello A, Young IS, Fletcher A. Plasma concentrations of carotenoids and vitamin C are better correlated with dietary intake in normal weight than overweight and obese elderly subjects. *Br J Nutr*. 2007;97:977–86.
18. Vioque J, Gonzalez L. Validity of a food frequency questionnaire (preliminary results). *Eur J Cancer Prev*. 1991;1:19–20.
19. United States Department of Agriculture (USDA). National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21 [consultado 29 Nov 2016]. Disponible en: <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md/beltsville-human-nutrition-research-center/nutrient-data-laboratory/docs/sr21-home-page/>.
20. Palma I, Farran A, Cantós D. Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2008.
21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
22. Oeth P, Beaulieu M, Park C, Kosman D, del Mistro G, van den Boom D, et al. iPLEX™ Assay: Increased plexing efficiency and flexibility for MassARRAY® system through single base primer extension with mass-modified terminators. SEQUENOM® Application Note; 2005. Disponible en: www.usc.es/cegen/wp-content/uploads/03/Sequenom-plex-assay.pdf.
23. Rohrmann S, Linseisen J, Boshuizen HC, Whittaker J, Agudo A, Vineis P, et al. Ethanol intake and risk of lung cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Am J Epidemiol*. 2006;164:1103–14.
24. Bagnardi V, Randi G, Lubin J, Consonni D, Lam TK, Subar AF, et al. Alcohol consumption and lung cancer risk in the Environment and Genetics in Lung Cancer Etiology (EAGLE) study. *Am J Epidemiol*. 2010;171:36–44.
25. Yoshida R, Shioji I, Kishida A, Ogawa Y. Moderate alcohol consumption reduces urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by inducing of uric acid. *Ind Health*. 2001;39:322–9.
26. Bianchini F, Vainio H. Wine and resveratrol: Mechanisms of cancer prevention. *Eur J Cancer Prev*. 2003;12:417–25.
27. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective. Washington D. C.: AICR; 2007.
28. Sun F, Tsuritani I, Yamada Y. Contribution of genetic polymorphisms in ethanol-metabolizing enzymes to problem drinking behavior in middle-aged Japanese men. *Behav Genet*. 2002;32:229–36.
29. Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A, McWilliams J, Henner WD, Taylor LM Jr, et al. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. *Circulation*. 1996;94:3074–8.
30. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3290–5.